


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 31/00</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/42088</b>
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	26. August 1999 (26.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/01153 (22) Internationales Anmeldedatum: 23. Februar 1999 (23.02.99) (30) Prioritätsdaten: 198 07 426.3        23. Februar 1998 (23.02.98)        DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): OTO- GENE AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DE); Vor dem Kreuzberg 17, D-72070 Tübingen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LÖWENHEIM, Hubert [DE/DE]; Philipp-von-Heck-Strasse 1, D-72076 Tübingen (DE). (74) Anwalt: RUFF, BEIER, SCHÖNDORF UND MÜTSCHLE; Willy-Brandt-Strasse 28, D-70173 Stuttgart (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu          veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: METHOD FOR THE TREATMENT OF DISEASES OR DISORDERS OF THE INNER EAR			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON ERKRANKUNGEN ODER STÖRUNGEN DES INNENOHRS			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for treating diseases or disorders of the inner ear which are related to damage to or the destruction of sensory cells of the inner ear. According to said method at least one active ingredient is used for the regeneration of the sensory cells which at least partly inhibits or eliminates the inhibiting action of a cell cycle inhibitor present in the inner ear, and regeneration of the sensory cells of the inner ear is preferably achieved by stimulating the proliferation of supporting cells. The sensory cells of the inner ear are the hair sensory cells. Potential cell cycle inhibitors are cyclin-dependent kinase inhibitors and particularly the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup>.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Bei einem Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen, wird zur Regeneration der Sinneszellen mindestens ein Wirkstoff eingesetzt, der mindestens einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhibierenden Wirkung mindestens teilweise hemmt oder ausschaltet. Die Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs erfolgt bei diesem Verfahren vorzugsweise durch Stimulation der Proliferation von Stützzellen. Bei den Sinneszellen des Innenohrs handelt es sich um die sogenannten Haarsinneszellen. Als Zellzyklus-Inhibitoren kommen Zyklinkinase-Inhibitoren wie insbesondere der Zyklinkinase-Inhibitor P27<sup>Kip1</sup> in Frage.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5                   Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen  
                    oder Störungen des Innenohrs

**Beschreibung**

10

Die Erfindung betrifft zunächst ein Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen.

15

Das Innenohr des Menschen und anderer Säugetiere kann entweder von vorneherein durch einen genetischen Defekt oder später durch äußere Einflüsse irreversibel geschädigt sein.

Bei den genannten äußeren Einflüssen kann es sich beispielsweise

20       um Schalltraumata oder um toxische oder hypoxische Einflüsse handeln. Diese Schädigungen können in Funktionsstörungen

oder Funktionsausfällen der im Innenohr lokalisierten Sinne, insbesondere des Hörens, resultieren. Bei diesen

Funktionsstörungen ist insbesondere eine Reduktion oder ein

25       Schwinden des Hörvermögens zu nennen. Schätzungsweise dürften

in Deutschland ca. 12 Millionen Menschen an einer sogenannten Innenohrschwerhörigkeit leiden, die auf die genannten Pathomechanismen zurückzuführen ist. Als Ursache für den teilweisen

oder vollständigen Verlust des Hörvermögens kommt hier

30       neben der Degeneration von sensorischen Neuronen und Schädigungen

der sogenannten Stria vascularis des Innenohrs, insbesondere eine Schädigung oder Zerstörung der Sinneszellen

des Innenohrs und damit des Hörorgans in Frage.

- Bei einem Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen im Zusammenhang stehen, ist zu berücksichtigen, daß in den hochdifferenzierten Sinnesepithelien im
- 5 Innenohr des Menschen und anderer Säuger irreversibel geschädigte und damit verlorene Zellen nicht mehr regeneriert werden können. Ein teilweiser oder vollständiger Hörverlust aufgrund Schädigung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs bleibt damit in der Regel irreversibel. Hier unter-
- 10 scheiden sich die Sinnesepithelien des Innenohrs grundlegend von anderen Geweben, in denen abgestorbene Zellen durch die Teilung von Ersatzzellen und deren anschließende Ausdifferenzierung schnell ersetzt werden können.
- 15 Interessanterweise ist bei anderen Wirbeltierklassen wie beispielsweise den Vögeln im Gegensatz zu der Situation beim Menschen eine Regeneration abgestorbener Sinneszellen im Innenohr möglich. Hier werden die nach einer Schädigung abgestorbenen Sinneszellen durch sogenannte Stützzellen, die
- 20 im Epithel unterhalb der Sinneszellen angeordnet sind, ersetzt. Dies erfolgt durch Teilung der Stützzellen und anschließende Ausdifferenzierung, wobei aus einer Stützzelle eine neue Stützzelle und eine Sinneszelle hervorgeht.
- 25 Die Entdeckung der Regeneration von Sinneszellen in der Cochlea des Vogels hat in den letzten Jahren zu dem Versuch geführt, Untersuchungsergebnisse beim Vogel auf Säugetiere und damit letztendlich auf den Menschen zu übertragen. Dies erschien unter anderem deshalb erfolgversprechend, da die
- 30 Cochlea des Vogels und die Cochlea von Säugern zellbiologische Gemeinsamkeiten aufweisen. Sowohl das Sinnesepithel der Vogelcochlea als auch das Sinnesepithel der Säugercochlea sind nämlich postmitotisch, das heißt die in den Sinnesepithelien vorhandenen Sinneszellen werden nur während eines

ganz bestimmten Zeitabschnitts in der embryonalen Entwicklung ausgebildet. Danach finden normalerweise keine weiteren Zellteilungen statt. Diese grundsätzliche Gemeinsamkeit macht aber die Erscheinung, daß sich im vestibulären Sinnesepithel  
5 des Vogels während seines gesamten Lebens Zellteilungen nachweisen lassen, beim Menschen jedoch nicht, schwer verständlich.

Da beim Vogel erkannt wurde, daß sogenannte Wachstumsfaktoren  
10 in der Vogelcochlea eine erhöhte Proliferationsrate hervorrufen können, wurden solche Wachstumsfaktoren auch in der Cochlea des Säugers eingesetzt. Es ließ sich jedoch keine reproduzierbare Wirkung nachweisen. Dies legt den Schluß nahe, daß trotz einer grundsätzlichen zellbiologischen Gemein-  
15 samkeit, andere signifikante Unterschiede zwischen Vogelcochlea und Säugercochlea vorhanden sein müssen. Diese könnten darin liegen, daß die Stützzellen der Vogelcochlea zwar wie beim Säuger postmitotisch sind, den Zellzyklus jedoch nur vorübergehend verlassen haben. Sie können dann  
20 beim Auftreten eines entsprechenden Signals wieder in den Zellzyklus eintreten. Derartige Stützzellen können als quiescent, das heißt in Wartestellung stehend bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu können die Stützzellen des Säugers eine sehr hohe und spezielle Differenzierung durchlaufen und  
25 damit den Zellzyklus irreversibel verlassen haben. Dementsprechend wären sie als terminal differenziert zu bezeichnen und beispielsweise den Neuronen vergleichbar. Dies kann für die Stützzellen des Säugers gelten, die als sogenannte Pillarzellen oder Deiterszellen bezeichnet werden. Solche  
30 Erklärungsmodelle für zellbiologische Unterschiede zwischen Vogelcochlea und Säugercochlea werden derzeit zum Anlaß genommen, die Regeneration der Sinneszellen beim Vogel noch detaillierter zu untersuchen, um später weitere dort erhaltene Ergebnisse auf den Säuger übertragen zu können.

Die Erfindung stellt sich demgegenüber die Aufgabe, einen neuen Ansatz zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung der Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen, zu finden. Hierbei soll weniger versucht werden, an anderen Wirbeltieren als den Säugern erhaltene Ergebnisse auf Säuger und insbesondere den Menschen zu übertragen, als vielmehr einen Wirkmechanismus und entsprechende Wirkstoffe zur Verfügung zu stellen, die direkt in die Zellvorgänge beim Säuger eingreifen und letztlich in einer Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs resultieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch das Verfahren mit den Merkmalen des Anspruch 1 bzw. durch die Verfahren mit den Merkmalen der Ansprüche 2 und 3. Bevorzugte Ausführungen sind in den abhängigen Ansprüchen 4 bis 21 dargestellt. Der Inhalt sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt dieser Beschreibung gemacht.

Das Verfahren der eingangs genannten Art ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein im Innenohr vorhandener sogenannter Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhibierenden Wirkung durch (mindestens) einen Wirkstoff mindestens teilweise gehemmt oder ausgeschaltet wird. Dies resultiert in einer Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs. Dieses Verfahren umfaßt patentrechtlich auch die Verwendung eines Wirkstoffs, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten, entweder direkt zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs oder indirekt zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs, wobei diese Erkrankungen/Störungen mit einer Schä-

digung oder Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen.

Die aus dem erfindungsgemäßen Verfahren resultierende Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs erfolgt vorzugsweise durch eine Stimulation der Proliferation von Stützzellen des Innenohrs, das heißt der ebenfalls im Sinnesepithel, meist zwischen und unterhalb der Sinneszellen angeordneten Stützzellen. Da einer oder mehrere Zellzyklus-Inhibitoren in den Stützzellen des Innenohrs zu finden sind, kann durch die Hemmung oder Ausschaltung deren inhibierender Wirkung durch einen geeigneten Wirkstoff die Zellteilung der Stützzellen initiiert und damit eine Grundvoraussetzung für die Schaffung von Ersatzzellen für abgestorbene Sinneszellen geschaffen werden. Die aus der Teilung der Stützzellen hervorgehenden Zellen können dann mindestens teilweise zu funktionsfähigen Sinneszellen ausdifferenzieren.

Bei den bisher genannten Sinneszellen des Innenohrs handelt es sich vorzugsweise um die sogenannten Haarsinneszellen oder kurz Haarzellen, die an ihrem oberen Ende haarähnliche Fortsätze, die sogenannten Stereozilien oder Sinneshärchen aufweisen. Diese Haarzellen befinden sich auf der Basilarmembran im sogenannten Corti-Organ und bilden in Form sogenannter äußerer Haarzellen und sogenannter innerer Haarzellen die eigentlichen Rezeptorzellen für die Schalltransduktion im Innenohr. Interessant für eine Regeneration sind sowohl die inneren als auch die äußeren Haarzellen, wobei eine Regeneration der äußeren Haarzellen aufgrund deren größerer Empfindlichkeit ein besonderes Anwendungsgebiet der Erfindung darstellt. Diejenigen Stützzellen, die den inneren oder äußeren Haarsinneszellen anatomisch besonders gut zugeordnet sind, kommen für einen Einsatz des erfindungsgemäß verwendeten Wirkstoffs in besonderer Weise in Frage. So befinden sich

neben den äußeren Haarsinneszellen als Stützzellen die sogenannten Hensenzellen, und unterhalb der äußeren Haarsinneszellen die sogenannten Deiterszellen und die "äußeren" Pillarzellen. Diese Hensenzellen, Deiterszellen und äußeren Pillarzellen sind dementsprechend als Ersatzzellen für die äußeren Haarsinneszellen besonders geeignet. In entsprechender Weise befinden sich neben und unterhalb der inneren Haarsinneszellen die sogenannten inneren Sulcuszellen als Stützzellen und unterhalb der inneren Haarsinneszellen auch die inneren Pillarzellen, die dementsprechend beide als Ersatzzellen für die inneren Haarsinneszellen in Betracht kommen. Dementsprechend kann ggf. eine Regeneration von inneren oder äußeren Haarzellen selektiv initiiert und beeinflußt werden. Hier kann auch auf die einschlägigen Fachbücher und Fachartikel über den Hörvorgang bei Säugern, insbesondere beim Menschen verwiesen werden. Die Regeneration der an der Schalltransduktion im Innenohr beteiligten Haarsinneszellen zur Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit bei einer vorliegenden Schädigung dieser Sinneszellen stellt das Hauptanwendungsgebiet der vorliegenden Erfindung dar.

Bei den Zellzyklus-Inhibitoren, die erfindungsgemäß in ihrer inhibierenden Wirkung gehemmt oder ausgeschaltet werden, kann es sich grundsätzlich um verschiedene physiologische Stoffe, insbesondere Proteine handeln, die verhindern, daß die Zelle den normalen Zellzyklus einschließlich Zellteilung durchlaufen kann. Vorzugsweise handelt es sich um die sogenannten cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKIs), also um Zyklinkinase-Inhibitoren. Von diesen ist bekannt, daß sie während der Entwicklung eines Organismus bei der Entstehung von terminal differenzierten Zellen verstärkt exprimiert werden und auf diese Weise einen Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus verhindern. Dies würde auch den Verlust der Teilungsfähigkeit solcher Zellen mit verstärkter Exprimierung



von Zyklinkinase-Inhibitoren erklären. Zellzyklus-Inhibitoren und dabei insbesondere Zyklinkinase-Inhibitoren der sogenannten CIP/KIP-Familie können selektiv in bestimmten Zelltypen exprimiert werden. Als bevorzugte Zyklinkinase-Inhibitoren sind hier insbesondere die als p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> bezeichneten Proteine zu nennen, wobei es sich erfindungsgemäß vorzugsweise um den Zyklinkinase-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> handelt. Aufgrund der selektiven Exprimierung solcher Inhibitoren und der daraus resultierenden unterschiedlichen Expressionsmuster kann die Erfindung zur selektiven Beeinflussung des Zellzyklus in einem bestimmten Zelltyp eingesetzt werden. Wird beispielsweise in einem bestimmten Zelltyp, wie beispielsweise den Stützzellen im Sinnesepithel des Innenohrs, selektiv oder doch zumindest mit einem beträchtlichen Anteil p27<sup>Kip1</sup> exprimiert, kann durch einen speziell auf diesen Inhibitor abgestellten Wirkstoff, dessen inhibierende Wirkung ausgeschaltet und damit die Proliferation der Stützzellen initiiert bzw. stimuliert werden. Über eine Ausdifferenzierung mindestens eines Teils der aus der Teilung der Stützzellen hervorgegangenen Zellen wird dann die Regeneration der Sinneszellen bewirkt.

Wie aus den bisherigen Ausführungen bereits hervorgeht, handelt es sich bei der Erkrankung oder Störung des Innenohrs erfindungsgemäß insbesondere um eine sogenannten Innenohrschwerhörigkeit. Diese steht mit der bereits erläuterten Schädigung oder Zerstörung der Haarsinneszellen im Innenohr im Zusammenhang.

Bei dem erfindungsgemäß einsetzbaren Wirkstoff, der den Zellzyklus-Inhibitor wiederum in seiner inhibierenden Wirkung hemmt oder ausschaltet, handelt es sich vorzugsweise um eine Substanz, die, üblicherweise intrazellulär, direkt oder indirekt auf den Inhibitor, das heißt üblicherweise ein

- Peptid oder Protein einwirkt. Dabei kann der Wirkstoff vorzugsweise als Peptid oder Protein vorliegen, das mit dem Inhibitor eine Peptid-Peptid- oder Protein-Protein-Wechselwirkung eingeht. Das wäre dann der Fall einer "direkten"
- 5 Beeinflussung der Funktion des Inhibitors. Wenn als Wirkstoff ein Nukleinsäuremolekül verwendet wird, das für die Aminosäuresequenz eines oben genannten Peptids/Proteins kodiert, kann man von einer "indirekten" Beeinflussung sprechen, da zunächst das kodierende Nukleinsäuremolekül in die entsprechende Zelle eingeschleust und anschließend das (direkt als
- 10 Wirkstoff dienende) Peptid-/Proteinmolekül exprimiert wird. Bei dem genannten Nukleinsäuremolekül kann es sich insbesondere um ein rekombiniertes Nukleinsäuremolekül handeln. Das Nukleinsäuremolekül kann grundsätzlich ein DNA-Molekül, ein
- 15 cDNA-Molekül oder ein RNA-Molekül sein.

- Ein weiterer Wirkstoff, der nach der Erfindung bevorzugt einsetzbar ist, ist ein Nukleinsäuremolekül, bei dem man sich die sogenannte Antisense-Technik zunutze macht. Bei dieser
- 20 dem Fachmann grundsätzlich bekannten Technik wird üblicherweise eine RNA verwendet, die zur RNA des normalen (physiologischen) Gens komplementär ist. Diese komplementäre RNA nennt man Antisense-RNA. Die Antisense-RNA kann die Synthese des zu dem Gen gehörenden Proteinprodukts verhindern. Dies
- 25 bedeutet im Fall der Erfindung, daß ein Nukleinsäuremolekül, beispielsweise die Antisense-RNA selbst oder die DNA, bei deren Transkription die Antisense-RNA entsteht, zur Hemmung oder Ausschaltung der inhibierenden Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors in den Organismus bzw. die Zelle eingebracht
- 30 wird. Dieses Einbringen kann vorzugsweise mit Hilfe von Lipidverbindungen geschehen, die zusätzlich virale Komponenten zum besseren Andocken und Eindringen des Nukleinsäuremoleküls in die Zelle tragen.

Wie geschildert kann der Wirkstoff bei der Erfindung eine un-  
mittelbare Wechselwirkung, vorzugsweise eine Peptid-Peptid-  
oder Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem Zellzyklus-  
Inhibitor eingehen. Der Wirkstoff kann jedoch auch mittelbar  
5 die inhibierende Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors hemmen  
oder ausschalten, indem er mit einem physiologischen Wechsel-  
wirkungspartner des Zellzyklus-Inhibitors mindestens genauso  
gut oder vorzugsweise besser wechselwirkt als der Zellzyklus-  
Inhibitor selbst. Auf diese Weise wird dann verhindert, daß  
10 der Zellzyklus-Inhibitor seine physiologische (inhibierende)  
Wirkung entfalten kann.

So ist es beispielsweise im Falle des Zyklinkinase-Inhibitors  
p27<sup>Kip1</sup> bekannt, daß dieser zusammen mit der zyklinabhängigen  
15 Kinase CDK2 und dem Zyklin A einen Proteinkomplex ausbildet.  
Dabei existieren bestimmte Stellen, an denen zwischen dem  
p27<sup>Kip1</sup> und CDK2 bzw. Zyklin A Peptid-Peptid-Wechselwirkungen  
stattfinden. So wurde beispielsweise eine Bindungsstelle sehr  
hoher Affinität zwischen p27<sup>Kip1</sup> und Zyklin A identifiziert  
20 und mehrere weniger starke Bindungsstellen zwischen p27<sup>Kip1</sup>  
und Zyklin A bzw. p27<sup>Kip1</sup> und CDK2. Greift man nun eine der  
Bindungsstellen heraus, an denen keine Bindung/Interaktion  
mit hoher oder sehr hoher Affinität vorliegt, so kann ein  
Wirkstoff, vorzugsweise in Form eines weiteren Peptids/Pro-  
25 teins ausgewählt oder entwickelt werden, der mit einem der  
beiden Wechselwirkungspartner an der betreffenden Bindungs-  
stelle eine Bindung/Interaktion mindestens gleich hoher oder  
vorzugsweise höherer Affinität eingeht. Dadurch wird dann die  
übliche physiologische Wechselwirkung gehemmt oder verhin-  
30 dert, da die entsprechende Bindungsstelle für den physiologi-  
schen Wechselwirkungspartner blockiert ist.

So kann beispielsweise für eine Bindungsstelle zwischen  
p27<sup>Kip1</sup> und Zyklin A, aber auch CDK2, eine optimierte Pep-

- tidstruktur oder optimierte Aminosäuresequenz für die Aminosäuresequenz des p27<sup>Kip1</sup> an dieser Stelle entwickelt werden, die dann an die entsprechende Sequenz des Zyklin A bzw. CDK2 an dieser Stelle mit besserer, das heißt höherer Affinität
- 5 bindet. Eine derartige optimierte Peptidstruktur umfaßt beispielsweise- und vorzugsweise bis zu 15 Aminosäuren und kann dann direkt in die Zelle eingebracht oder vorzugsweise durch ein künstlich eingebrachtes Gen intrazellulär exprimiert werden. Durch die hohe Affinität eines solchen Peptids wird dann die
- 10 Wechselwirkung der physiologischen Peptidpartner gestört und die Ausbildung des Peptidkomplexes, auf der die inhibierende Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors beruht, verhindert. Auf diese Weise sorgt dann der Wirkstoff für eine mindestens teilweise Hemmung oder eine vollständige Ausschaltung der
- 15 inhibierenden Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors. Durch diesen Verfahrensansatz der Erfindung muß die Konzentration des Wirkstoffs, insbesondere des Peptids/Proteins mit der entsprechenden Aminosäuresequenz in der Zelle nur etwa gleich hoch sein wie die entsprechende Konzentration des Zellzyklus-
- 20 Inhibitors, der in seiner Wirkung gehemmt oder ausgeschaltet werden soll. Da derartige Konzentrationen, beispielsweise von p27<sup>Kip1</sup> in der Größenordnung von ca. 10 nM/l liegen und etwa 1000 bis 10000 Molekülen pro Zelle entsprechen, können bereits sehr niedrige Konzentrationen für die Durchführung
- 25 der Erfindung ausreichen. Wichtig ist ebenfalls, daß zum Erreichen einer solchen Konzentration mit Hilfe gentherapeutischer Methoden bereits das Einschleusen einer einzigen Kopie einer DNA, die für die entsprechende Aminosäuresequenz kodiert, pro Zelle ausreicht. Dies stellt gegenüber anderen
- 30 Methoden, die mit viel höheren Konzentrationen oder einer größeren Vielzahl von DNA-Kopien arbeiten müssen, einen entscheidenden Vorteil dar.

In Weiterbildung kann das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt werden, daß der Wirkstoff in Form eines sogenannten Vektors oder Vehikels vorliegt, wobei dieser Vektor oder dieses Vehikel mindestens eines der bereits beschriebenen Nukleinsäuremoleküle trägt. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein Nukleinsäuremolekül, das für die Aminosäuresequenz eines als Wirkstoff dienenden Peptids oder Proteins kodiert. Bei den genannten Vektoren kann es sich um die üblichen viralen und nicht-viralen Vektoren handeln, wie sie dem Fachmann bekannt sind. So können in üblicherweise Retroviren, Adenoviren oder adeno-assoziierte Viren als virale Vektoren eingesetzt werden. Bei nicht-viralen Vektoren ist bekanntermaßen keine virale DNA beteiligt, so daß hier grundsätzlich eine "nackte" DNA in eine Zelle eingebracht werden kann. Vorzugsweise werden derartige Nukleinsäuremoleküle jedoch üblicherweise in sogenannte Liposomen oder Lipoplexe verpackt sein und in dieser Form in den Organismus und die Zelle eingebracht werden. Der Einsatz von nicht-viralen Vektoren bzw. Lipoplexen ist grundsätzlich bevorzugt, da virale Vektoren einige, dem Fachmann bekannte Nachteile aufweisen. Aufgrund der soeben geschilderten Einsatzmöglichkeiten der Erfindung kann hier häufig ohne Verwendung viraler Vektoren gearbeitet werden, da die Effektivität der verwendeten Wirkstoffe selbst sehr hoch ist und dementsprechend mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet werden kann.

Bei der Erfindung wird der verwendete Wirkstoff vorzugsweise in einer therapeutisch wirksamen Menge eingesetzt. Dieser kann in üblicher Weise auf das zu behandelnde Subjekt abgestellt sein, wobei u.a. bekannte pharmazeutische Zusatzstoffe zum Einsatz kommen können. In Weiterbildung kann der verwendete Wirkstoff und dementsprechend auch das erfindungsgemäße Verfahren zur lokalen Applikation vorgesehen sein. Damit können mögliche Nachteile einer systemischen Applikation

vermieden werden. Der Zielort des erfindungsgemäßen Verfahrens, nämlich das Innenohr, ist für eine lokale Applikation in besonderem Maße geeignet. So kann der Wirkstoff im vorliegenden Fall in den sogenannten Perilymphraum des Innenohrs des Säugers, insbesondere des Menschen eingebracht werden. Hier handelt es sich um einen kleinen Flüssigkeitsraum mit sehr langsamer Austauschgeschwindigkeit, der einer therapeutischen Intervention vom Mittelohr her, beispielsweise über die Membran des runden Fensters, zugänglich ist. Dieser Perilymphraum hat ein Volumen von nur etwa 20 Mikrolitern und steht zudem in direktem Kontakt mit den Zellen des Corti-Organs. Damit ist ein direktes Einwirken des Wirkstoffes auf das Sinnesepithel mit seinen Haarzellen und Stützzellen gewährleistet.

Weiter umfaßt die Erfindung den Wirkstoff selbst, dessen Verwendung in dem bereits beschriebenen Verfahren ausführlich dargestellt ist. Auf den Inhalt und Wortlaut der Ansprüche 22 bis 27 wird Bezug genommen. Dieser Wirkstoff ist zur Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs, insbesondere der Haarsinneszellen des Innenohrs ausgebildet und in der Lage, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner (inhibierenden) Wirkung mindestens teilweise zu hemmen oder auszuschalten. Bei dem Zellzyklus-Inhibitor handelt es sich vorzugsweise um einen Zyklinkinase-Inhibitor, insbesondere den Zyklinkinase-Inhibitor p27Kip1. Bezüglich der genauen und bevorzugten Eigenschaften des Wirkstoffs wird auf die bisherigen Ausführungen Bezug genommen und verwiesen. Wie geschildert kann es sich hierbei vorzugsweise um mindestens ein Peptid/Protein oder um mindestens ein Nukleinsäuremolekül handeln, wobei letzteres vorzugsweise eine Antisense-DNA oder Antisense-RNA ist oder vorzugsweise für ein entsprechendes als Wirkstoff einsetzbares Peptid/Protein

kodiert. Bei dem Nukleinsäuremolekül kann es sich um ein DNA-Molekül, ein cDNA-Molekül oder ein RNA-Molekül handeln. Insbesondere das Nukleinsäuremolekül wird mit Hilfe eines geeigneten Vektors oder Vehikels in den Organismus bzw. die  
5 Zelle eingebracht, wobei es sich um die beschriebenen viralen oder nicht-viralen Vektoren bzw. um in Liposomen/Lipoplexten verpackte Nukleinsäuremoleküle handeln kann.

Schließlich umfaßt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung oder ein Medikament, das mindestens einen Wirkstoff, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten, in einer wirksamen Menge sowie üblicherweise einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält. Bezüglich des in der Zusammensetzung bzw. dem Medikament enthaltenen Wirkstoffs wird ausdrücklich auf die bisherigen Ausführungen Bezug genommen. Auf den Inhalt der Ansprüche 28 und 29 wird ausdrücklich verwiesen.

20 Die beschriebenen Merkmale und weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung einer bevorzugten Ausführungsform in Verbindung mit den Unteransprüchen, dem Beispiel und der Zeichnung. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils einzeln für sich oder zu mehreren in Kombination miteinander verwirklicht sein.

In der Zeichnung zeigt:

Figur 1 die elektronenmikroskopische Aufnahme einer in Kernteilung befindlichen Zelle im sensorischen Epithel des Corti-Organes einer sogenannten p27<sup>Kip</sup>-Knockout-Maus.

### Beispiel

- Für den Versuch wird eine sogenannte p27<sup>Kip1</sup>-Knockout-Maus (p27<sup>-/-</sup>) verwendet, das heißt eine Maus, der das Gen zur Expression des Proteins p27<sup>Kip1</sup> fehlt. Dementsprechend kann in einer solchen Maus p27<sup>Kip1</sup> seine Zellzyklus-inhibierende Wirkung per se nicht entfalten.
- 10 Von einer solchen p27<sup>Kip1</sup>-Knockout-Maus wird am siebten Tag nach der Geburt (postnataler Tag 7) das Cortishe Organ entnommen und in üblicher Weise für eine elektronenmikroskopische Untersuchung derart präpariert, daß das sensorische Epithel des Cortischen Organs zu sehen ist.
- 15 Das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Untersuchung ist in Figur 1 dargestellt. In dieser elektronenmikroskopischen Aufnahme ist zu erkennen, daß zwischen zwei links oben bzw. rechts unten befindlichen inneren Haarzellen, von denen die
- 20 schwarz umrandeten Zellkerne links oben (vollständig) und rechts unten (teilweise) zu erkennen sind, eine in Kernteilung (Mitose) befindliche Zelle, das heißt eine mitotische Zelle angeordnet ist. Die Mitose ist eindeutig erkennbar am kondensierten Chromatin, der aufgelösten Kernmembran und dem
- 25 Basalkörperchen. Die links oben angeordnete innere Haarzelle und das Basalkörperchen sind in der Figur zur besseren Erkennbarkeit mit englischsprachiger Beschriftung bezeichnet.
- Damit ergibt sich aus Figur 1 eindeutig, daß das Fehlen des Zellzyklus-Inhibitors p27<sup>Kip1</sup> dazu führt, daß im Sinnesepithel des Cortischen Organs der Maus eine Zellteilung von dort angeordneten Stützzellen möglich ist. Hierbei ist noch zu erwähnen, daß es sich bei der in Figur 1 dargestellten Zellteilung nicht um eine Einzelerscheinung innerhalb des sensori-
- 30



schen Epithels des Corti-Organs handelt, sondern daß sehr viele dort befindliche Zellen eine Zellteilung und damit den Zellzyklus durchlaufen. Die in Figur 1 dargestellte Erscheinung läßt den Schluß zu, daß nicht nur eine Zellteilung, sondern nach einer Zellteilung, die den entscheidenden Schritt im Haarzellregenerationsprozess darstellt, im weiteren auch eine Differenzierung zu Haarsinneszellen und schließlich eine funktionelle Erholung der Hörfunktion des Sinnesorgans eintritt. Damit ist eine Regeneration der Sinneszellen möglich. Für die Zulässigkeit dieses Schlusses spricht auch, daß bei der Knockout-Maus nicht nur eine Mitose stattfindet, sondern daß derartige Knockout-Mäuse auch mehr Haarzellen besitzen als normale Mäuse, bei denen das Protein p27<sup>Kip1</sup> exprimiert wird. Dementsprechend resultiert die Mitose der Stützzellen auch in ausdifferenzierten Sinneszellen. Die Richtigkeit dieses Schlusses wird durch die folgenden Ergebnisse bestätigt. Bei heterozygoten Knockout-Mäusen wurde die Regeneration der Haarzellen dadurch nachgewiesen, daß in der zweiten Lebenswoche der Tiere, wenn diese die Hörfunktion entwickeln, die Haarzellen durch systemische Verabreichung von Amikacin zerstört wurden. Nach weiteren zwei Wochen ohne jede Injektion wurden die Tiere getötet und ihre Cochlea untersucht. Dabei zeigten sich neu gebildete Haarzellen in der Cochlea, die durch einen, beispielsweise mit dem Amikacin verabreichten, Proliferationsmarker (Bromdesoxyuridin (BrdU)) markiert sind.

Als Konsequenz daraus läßt sich nicht nur bei Knockout-Mäusen, denen das Gen für p27<sup>Kip1</sup> von vornherein fehlt, sondern auch durch eine Hemmung oder Ausschaltung des im normalen Organismus exprimierten p27<sup>Kip1</sup>, beispielsweise mit Hilfe eines mit dem p27<sup>Kip1</sup> oder einem seiner physiologischen Partner wechselwirkenden Peptids, mit Hilfe der für dieses Peptid kodierenden Nukleinsäuresequenz oder mit Hilfe

einer Antisense-DNA/Antisense-RNA eine Regeneration der Sinneszellen erreichen. Dies kann auch durch eine nur teilweise Ausschaltung der Funktion von p27<sup>Kip1</sup> geschehen, da bei den heterozygoten Mäusen ein Gen-Dosis abhängiger Effekt  
5 beobachtet wird.

- - - - -

Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen  
oder Störungen des Innenohrs

5

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Behandlung von Erkrankungen oder Störungen  
des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder Zerstörung  
10 von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammenhang stehen,  
dadurch gekennzeichnet, daß zur Regeneration der Sinnes-  
zellen des Innenohrs mindestens ein im Innenohr vorhan-  
dener sogenannter Zellzyklus-Inhibitor in seiner inhi-  
bierenden Wirkung durch einen Wirkstoff mindestens  
15 teilweise gehemmt oder ausgeschaltet wird.
2. Verwendung eines Wirkstoffs, der in der Lage ist, einen  
im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor  
in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten, zur Be-  
20 handlung von Erkrankungen oder Störungen des Innenohrs,  
die mit einer Schädigung oder Zerstörung von Sinneszel-  
len des Innenohrs im Zusammenhang stehen.
3. Verwendung eines Wirkstoffs, der in der Lage ist, einen  
25 im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor  
in seiner Wirkung zu hemmen oder auszuschalten, zur Her-  
stellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder  
eines Medikaments zur Behandlung von Erkrankungen oder  
Störungen des Innenohrs, die mit einer Schädigung oder  
30 Zerstörung von Sinneszellen des Innenohrs im Zusammen-  
hang stehen.
4. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden  
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Regeneration

der Sinneszellen des Innenohrs durch Stimulation von Proliferation von Stützzellen des Innenohrs erfolgt.

5. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Sinneszellen des Innenohrs um sogenannte Haarsinneszellen handelt.
6. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Zellzyklus-Inhibitor um einen Zyklinkinase-Inhibitor handelt.
7. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Zyklinkinase-Inhibitor um den Zyklinkinase-Inhibitor p27<sup>Kip1</sup> handelt.
8. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Erkrankung oder Störung des Innenohrs um eine Innenohrschwerhörigkeit handelt.
9. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirkstoff um mindestens ein Peptid oder mindestens ein Protein handelt.
10. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirkstoff um mindestens ein Nukleinsäuremolekül, insbesondere rekombiniertes Nukleinsäuremolekül handelt.
11. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 10, dadurch ge-

kennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül für ein Peptid oder ein Protein nach Anspruch 9 kodiert.

- 5           12. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül ist.
- 10           13. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein cDNA-Molekül ist.
- 15           14. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein RNA-Molekül ist.
- 20           15. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in Form eines sogenannten Vektors vorliegt, wobei vorzugsweise der Vektor ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 10 bis 14 trägt.
- 25           16. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Vektor um einen viralen Vektor handelt.
- 30           17. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Virus um ein Retrovirus, ein Adenovirus oder ein adeno-assoziiertes Virus handelt.
18. Verfahren oder Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Vektor um einen nicht-viralen Vektor handelt.

19. Verfahren oder Verwendung nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein in ein Liposom oder einen Lipoplex verpacktes Nukleinsäuremolekül handelt.
- 5
20. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in einer therapeutisch wirksamen Menge eingesetzt wird.
- 10 21. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff zur lokalen Applikation vorgesehen ist.
- 15 22. Wirkstoff zur Regeneration der Sinneszellen des Innenohrs, insbesondere der Haarsinneszellen des Innenohrs, dadurch gekennzeichnet, daß er in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung mindestens teilweise zu hemmen oder auszuschalten.
- 20 23. Wirkstoff nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Zellzyklus-Inhibitor ein Zyklinkinase-Inhibitor, vorzugsweise der Zyklinkinase-Inhibitor p27Kip1 ist.
- 25 24. Wirkstoff nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mindestens ein Peptid oder mindestens ein Protein handelt.
- 30 25. Wirkstoff nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um mindestens ein Nukleinsäuremolekül, vorzugsweise ein rekombiniertes Nukleinsäuremolekül handelt.

26. Wirkstoff nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül, cDNA-Molekül oder RNA-Molekül ist.
- 5 27. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff in Form eines sogenannten Vektors oder Vehikels vorliegt, wobei dieser vorzugsweise gekennzeichnet ist durch mindestens eines der Merkmale der Ansprüche 15 bis 19.
- 10 28. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Medikament, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens einen Wirkstoff, der in der Lage ist, einen im Innenohr vorhandenen sogenannten Zellzyklus-Inhibitor in seiner Wirkung zu hemmen
- 15 oder auszuschalten in einer wirksamen Menge und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.
- 20 29. Pharmazeutische Zusammensetzung oder Medikament nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ein Wirkstoff nach einem der Ansprüche 23 bis 27 ist.

- - - - -

1/1

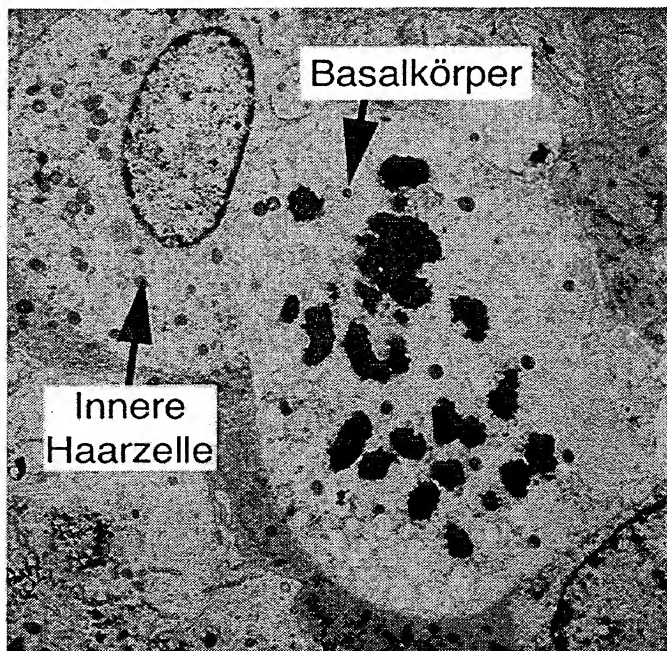


Fig. 1